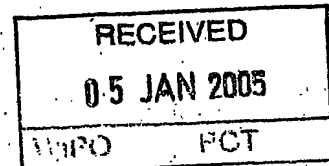


**PRIORITY
DOCUMENT**

SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)



**Prioritätsbescheinigung über die Einreichung
einer Patentanmeldung**

Aktenzeichen:

103 52 837.7

Anmeldetag:

10. November 2003

Anmelder/Inhaber:

NUTRINOVA Nutrition Specialties & Food
Ingredients GmbH, 65929 Frankfurt/DE

Bezeichnung:

Prozess zur Kultivierung von Mikroorganismen
der Gattung Thraustochytriales

IPC:

C 12 N 1/00

Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ursprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.

München, den 5. November 2004
Deutsches Patent- und Markenamt
Der Präsident
Im Auftrag

Klostermeyer

27.10.03



ax03303

10. November 2003

kd/bse

f:\ib4lsp\lspanm\bse02051.rtf

NUTRINOVA
Nutrition Specialties &
Food Ingredients GmbH
Industriepark Höchst
D-65926 Frankfurt am Main

Prozess zur Kultivierung von Mikroorganismen der Gattung
Thraustochytriales

Prozess zur Kultivierung von Mikroorganismen der Gattung Thraustochytriales.

Verschiedene mehrfach-ungesättigte Fettsäuren (PUFAs für polyunsaturated fatty acids) und insbesondere omega-3 Fettsäuren (n3-Fettsäuren) sind essentielle Bestandteile der menschlichen Ernährung.

Allerdings ist bekannt, dass in den meisten Industrienationen die Versorgung mit n3-Fettsäuren mangelhaft ist. Dagegen ist der Gesamtfettanteil in der Ernährung, sowie die Zufuhr an gesättigten Fettsäuren und n6-Fettsäuren zu hoch. Dies beruht auf einer Veränderung unserer Nahrungszusammensetzung, die vor allem in den letzten ca. 150 Jahren stattgefunden hat und die mit dem Auftreten verschiedener chronischer Zivilisationskrankheiten, wie beispielsweise Herz-Kreislauf-erkrankungen - der Haupttodesursache in Industrienationen - korreliert wird (Simopoulos, A.P., 1999, Am. J. Clin. Nutr. 70, 560-569). Eine Vielzahl von Studien hat inzwischen gezeigt, dass durch die gezielte Erhöhung der Zufuhr von n3-Fettsäuren, insbesondere von Eicosapentaensäure (EPA) und von Docosahexaensäure (DHA), das Herz-Kreislauf-Risiko signifikant reduziert werden kann (GISSI-Prevenzione Investigators (Gruppo Italiano per lo Studio della Sopravvivenza nell'Infarto miocardico), 1999, Dietary supplementation with n-3 polyunsaturated fatty acids and vitamin E after myocardial infarction: results of the GISSI-prevenzione trial., Lancet 354, 447-455; Burr *et al.*, 1989, Effects of changes in fat, fish, and fibre intake on death and myocardial reinfarction: diet and reinfarction trial (DART). Lancet 2, 757-761). Dementsprechend wird von vielen verschiedenen Organisationen (WHO, FAO, AHA; ISSFAL, British Nutrition Foundation u.v.a.) empfohlen, die Zufuhr von n3-Fettsäuren signifikant zu erhöhen (Kris-Eherton *et al.*, Fish Consumption, Fish Oil, Omega-3 Fatty Acids, and Cardiovascular Disease. Circulation 2002, 2747-2757).

Quellen für die Gewinnung von PUFAs und insbesondere n3-Fettsäuren sind vor allem marine Kaltwasserfische und daraus gewonnene Öle, aber auch marine Mikroorganismen, welche gegenüber Fischen den Vorteil haben, dass sie in Fermentern unter kostengünstigen und kontrollierten Bedingungen zur Produktion von PUFAs herangezogen werden können. Bei einer fermentativen Herstellung besteht keine Gefahr der Verunreinigungen, wie sie für Fische oder daraus gewonnene Fischöle oft beschrieben werden (Olsen SF. Int J Epidemiol. 2001; 1279-80). Außerdem lässt sich die Zusammensetzung der gewonnenen Öle durch Auswahl des Organismus und der Kulturbedingungen positiv beeinflussen und ist nicht

saisonalen Schwankungen unterworfen, wie dies ebenfalls für Fisch und Fischprodukte beschrieben ist (Gamez-Meza et al. Lipids 1999:639-42).

Mikroorganismen, welche sich zur Gewinnung von n3-PUFA eignen, finden sich beispielsweise bei den Bakterien unter der Gattung *Vibrio* (z. B.: *Vibrio marinus*) oder unter den Dinoflagellaten (*Dinophyta*), dort insbesondere die Gattung *Crypthecodinium*, wie *C. cohnii* oder unter den Stramenopiles, wie die *Pinguiphyceae* wie z.B. *Glossomastix*, *Phaeomonas*, *Pinguiochrysis*, *Pinguicoccus* und *Polydochrysis*. Bevorzugte Mikroorganismen zur fermentativen Herstellung von PUFA gehören zu den Stramenopiles (oder *Labyrinthulomycota*), insbesondere zur Ordnung *Thraustochytriales*, (*Thraustochytriidea*) und dort wieder insbesondere zu den Gattungen *Japonochytrium*, *Schizochytrium*, *Thraustochytrium*, *Althornia*, *Labyrinthuloides*, *Aplanochytrium* und *Ulkenia*.

Es ist bekannt, dass einige der genannten Mikroorganismen zur industriellen Produktion von Fettsäuren verwendet werden können, entsprechende Verfahren wurden beschrieben. So offenbart die internationale Patentanmeldung WO 91/07498 A1 die Herstellung von PUFAs mit Organismen der Gattungen *Schizochytrium* und *Thraustochytrium*. WO 91/11918 A1 offenbart die Herstellung von PUFAs mit *Crypthecodinium cohnii*, WO 96/33263 A1 und die entsprechende europäische Patentanmeldung EP 0 823 475 A1 beschreiben die Herstellung von PUFAs mit Mikroorganismen der Gattung *Schizochytrium*, während die Patentanmeldung WO 98/03671 die Herstellung von PUFAs mit Mikroorganismen der Gattung *Ulkenia* offenbart.

Der natürliche Lebensraum der beschriebenen Mikroorganismen und insbesondere der *Labyrinthulomycota* sind marine Habitate. Herkömmlicherweise werden diese Mikroorganismen also in entsprechend salzhaltigen Medien kultiviert, wobei für die Zwecke der vorliegenden Erfindung der Salzgehalt von Meerwasser bei 32-35 g/l und einem Anteil von 90-95% an Natrium und Chlorid definiert wird. Typische Medien zur Kultivierung von marinen Mikroorganismen wie *Thraustochytrium* oder *Schizochytrium* basieren auf Seewasser (z.B. ATCC (American Type Culture Collection) 790 By+ Medium [Hefeextrakt 1.0 g, Peptone 1.0 g, D+-Glucose 5.0 g, Seewasser 1 L]). Es ist aber auch bekannt, dass Mikroorganismen der Ordnung *Thraustochytriales* bei sehr niedriger Salinität im Kulturmedium überleben können. Ihr Wachstum wird jedoch unterhalb einer Grenze von 7,5 - 15 g Salz/L, entsprechend einer Salinität von 7,5 - 15‰, als nur sehr gering und ohne

Zwischenmaxima im niedrigen Salinitätsbereich beschrieben. Optimale Wachstumsraten werden nur oberhalb der oben angegebenen Salinitätsgrenze erzielt (Fan et al. Botanica Marina 45, 2002, S. 50-57).

Ein häufig auftretendes Problem fermentativer Prozesse sind starke pH-Schwankungen im Verlauf der Kultivierung als Folge des Auftretens von Stoffwechselprodukten und/oder des Verbrauchs von einzelnen Medienkomponenten. Dies gilt insbesondere für salzreiche Medien zur Fermentation mariner Mikroorganismen. Daher benötigen solche Fermentationen oft eine pH-Regulierung. Die Steuerung des pH-Wertes führt allerdings bei Fermentationen im Großmaßstab zu einem erheblichen Mehraufwand. Dabei werden zusätzliche Behältnisse für die Zugabe von Säuren und Laugen benötigt, die ansonsten anderweitig für die Zufütterung additiver Komponenten verwendet werden könnten. Weiterhin muß die Titration zur Regulierung des pH-Wertes technisch gesteuert werden. Im Zusammenhang mit der Fermentation von *Labyrinthulomycota* zur Gewinnung von PUFA im Produktionsmaßstab werden im Stand der Technik pH-Wert kontrollierte Kultivierungsmethoden eingesetzt.

Die Kontrolle des pH-Wertes über ansonsten in der Zellkultur übliche Puffersysteme weist jedoch Nachteile auf. So ist die Pufferkapazität von zum Beispiel TRIS, HEPES und MOPS aufgrund ihrer pK_a -Werte über 7, im für die PUFA-Fermentation notwendigen pH-Bereich nicht ausreichend. TRIS ist weiterhin ein schlechter Puffer in pH-Bereichen unter 7,5, ein potentiell reaktives primäres Amin und kann an den unterschiedlichsten biologischen Reaktionen aktiv teilnehmen. Phosphatpuffer, ein ebenfalls häufig eingesetzter Puffer, hat die Eigenschaft bei Gegenwart von divalenten Kationen aus der Lösung auszufallen und ist ferner eine schlechte Wahl bei fermentativen Prozessen, die Phosphat benötigen bzw. verbrauchen. Acetatpuffer sind aufgrund ihres engen Pufferbereichs und durch die Tatsache, dass sie im Verlauf der Fermentation metabolisiert werden, ungeeignet. Darüber hinaus sind viele alternative Puffersysteme infolge hoher Kosten unwirtschaftlich.

In Anbetracht des Standes der Technik war es daher Aufgabe der vorliegenden Erfindung ein neues, einfaches und wirtschaftliches Kultivierungsverfahren für marine Mikroorganismen zur Verfügung zu stellen. Hierbei sollte eine starke Vereinfachung der Prozeßführung erreicht werden. Abgesehen von der Kosteneffizienz sollte das Verfahren die Herstellung hoch reiner PUFAs in hoher Ausbeute ermöglichen.

+ 27.10.04

Gelöst werden diese sowie weitere, nicht explizit genannten Aufgaben, die jedoch aus den hierin einleitend diskutierten Zusammenhängen ohne weiteres ableitbar oder erschließbar sind, durch den Gegenstand, der in den Ansprüchen der vorliegenden Erfindung definiert ist.

5 Ein vorteilhaftes Verfahren für die Kultivierung von Mikroorganismen der Ordnung *Thraustochytriales* wird durch das in Anspruch 1 definierte Verfahren zur Verfügung gestellt. Dieses Verfahren umfasst die Kultivierung in einem ausschließlich durch CaCO_3 pH-Wert stabilisierten Medium, umfassend einen CaCO_3 -Gehalt von 3-15 g/L und gegebenenfalls die anschließende Isolation der PUFAs aus den Mikroorganismen und/oder dem Kulturmedium.

Die Erfindung umfasst weiterhin ein Verfahren zur Produktion hochreiner PUFAs.

Bevorzugte PUFAs sind erfindungsgemäß DHA und DPA.

Insbesondere zeigen die in dem oben genannten Verfahren kultivierten Mikroorganismen eine Produktion von mehr als 10%, bevorzugt mehr als 14%, und ganz besonders bevorzugt mehr als 18% DHA pro Biotrockenmasse

15 Insbesondere zeigen die in dem oben genannten Verfahren kultivierten Mikroorganismen eine Produktion von mehr als 1%, bevorzugt mehr als 2%, und ganz besonders bevorzugt mehr als 3% DPA pro Biotrockenmasse.

Durch an die Kultivierung anschließende Isolation der PUFAs aus den Mikroorganismen (Biomasse) und/oder dem Kulturmedium können die PUFAs in hoher Ausbeute und Reinheit gewonnen werden.

Weiterhin umfasst die vorliegende Erfindung auch ein Verfahren zur Herstellung von Biomasse, wobei die Biomasse durch das erfindungsgemäße Kultivierungsverfahren zur Verfügung gestellt wird.

25 Diese Biomasse kann auf alle erdenklichen Arten Verwendung finden. Insbesondere kann diese Biomasse, z.B. in getrocknetem Zustand (Biotrockenmasse), direkt als Nahrungsmittel oder als Futtermittel eingesetzt werden.

Weiterhin umfasst die Erfindung auch ein Öl, welches dadurch gewonnen wird, dass das erfindungsgemäße Kultivierungsverfahren durchgeführt wird, und das Öl aus den Mikroorganismen und/oder dem Kulturmedium isoliert wird.

30 Insbesondere handelt es sich dabei um ein Öl, welches neben vielen weiteren bevorzugten Verwendungszwecken mit Vorteil für die menschliche Ernährung verwendet werden kann.

+ 27.10.04

Dabei zeigen die Mikroorganismen unter erfindungsgemäßen Bedingungen eine Produktion von mehr als 30 Gew.-% Öl, bevorzugt von mehr als 35 Gew.-% Öl pro Gewichtseinheit Biotrockenmasse.

5 Unter Öl wird erfindungsgemäß ein Anteil von mindestens 70 % Neutrallipiden und mindestens 2% Phospholipiden verstanden, was dem normalen, dem Fachmann bekannten Fettsäurespektrum der *Thraustochytriales* entspricht. Die Neutrallipide bestehen dabei aus mindestens 80% Triglyzeriden und anderen Verbindungen wie z.B Diacylglyzeride, Sterole usw. Weiterhin besteht der Gewichtsanteil der Triglyzeride aus etwa 95% Fettsäuren und 5% Glyzerin.

10 Die Möglichkeit einen marinen Mikroorganismus für die Produktion von PUFA ohne externe pH-Wert Regulierung fermentieren zu können, insbesondere unter Bedingungen, die ein rasches Wachstum unter hohem Glukoseverbrauch ermöglichen, war völlig überraschend. Gerade unter solchen Bedingungen kommt es bei der Fermentation von marinen Mikroorganismen ohne entsprechende pH-Kontrolle sehr schnell zu einer Ansäuerung des
15 Mediums, die zum Einstellen des Wachstums führt (siehe Beispiel 1 und Wen, Z.-Y. and Chen, F., 2003, Biotechnology Advances 21, 273-294).

Das erfindungsgemäße Verfahren kommt überraschenderweise ohne den Zusatz sonstiger pH-Wert stabilisierender Mittel aus. Unter pH-Wert stabilisierenden Mitteln wird erfindungsgemäß sowohl der in Abhängigkeit von dem sich während der Kultur einstellenden
20 pH-Wert geregelte Zusatz von Säure oder Base aus Zusatztanks als auch die Verwendung von Puffersystemen im Medium selbst verstanden, obwohl den Erfindern wirtschaftlich nutzbare Kultivierungsverfahren unter Verwendung von Puffersystemen wie TRIS oder Phosphat-Puffer nicht bekannt sind.

Darüber hinaus sind viele alternative Puffersysteme gegenüber der Verwendung von
25 Calciumcarbonat, infolge höherer Kosten, unwirtschaftlich.

Die hohe Wirksamkeit von Calciumcarbonat als Puffer für die Kultivierung von Mikroorganismen der Ordnung *Thraustochytriales* ist überraschend, da entstehendes Kohlendioxid nur eine begrenzte Löslichkeit in Wasser besitzt und dadurch die Pufferkapazität während der Fermentation abnimmt.

Erstaunlicherweise war nicht nur die Fermentation bis zum vollständigen Verbrauch von Glukose möglich, es erhöhte sich darüber hinaus auch der Anteil der PUFA in der Biomasse signifikant bei Einsatz des erfindungsgemäßen Calciumcarbonat stabilisierten Mediums. Noch überraschender ist, dass die Glukoseverwertung und damit verbunden die PUFA-Produktion beschleunigt wird und so zu einer erhöhten Raum-Zeit-Ausbeute führt.

Bis zur vorliegenden Erfindung gab es keinen bekannten Fermentationsprozess zur Produktion von n3-Fettsäuren in Mikroorganismen aus der Ordnung *Thraustochytriales* unter Verwendung eines mit Calciumcarbonat pH-stabilisierten Mediums, wobei auf weitere pH-Wert stabilisierende Mittel verzichtet werden konnte.

PUFAs sind erfindungsgemäß mehrfach ungesättigte langkettige Fettsäuren mit einer Kettenlänge >C12 mit mindestens zwei Doppelbindungen. Nach dem erfindungsgemäßen Verfahren herstellbare PUFAs sind insbesondere n3-Fettsäuren und n6-Fettsäuren.

Unter n3-Fettsäuren (omega-3 Fettsäure, ω 3 Fettsäuren) im erfindungsgemäßen Sinn werden mehrfach ungesättigte langkettige Fettsäuren mit einer Kettenlänge >C12 mit mindestens zwei oder mehr Doppelbindungen verstanden, wobei die erste der Doppelbindungen zwischen den Kohlenstoffatomen C3 und C4 ausgehend vom Alkylende konstituiert ist. Dementsprechend liegt bei n6-Fettsäuren die erste Doppelbindung zwischen den Kohlenstoffatomen C6 und C7 ausgehend vom Alkylende.

Für die Produktion der PUFAs nach dem erfindungsgemäßen Verfahren kommen Mikroorganismen aus der Gruppe der Labyrinthulomycota in Frage. Mikroorganismen der Ordnung *Thraustochytriales* (*Thraustchytriidea*) sind bevorzugt (Lewis, T.E., Nichols, P.D., McMeekin, T.A., The Biotechnological Potential of Thraustochytrids, Marine Biotechnology, 1999, S. 580-587 und Porter, D. Phylum Labyrinthulomycota in Handbook of protocista: the structure, cultivation, habitats, and life histories of the eukaryotic microorganisms and their descendants exclusive of animals, plants, and fungi: a guide to the algae, ciliates, foraminifera, sprorozoa, water molds, and other protocists. Editors: Margulis, L, Corliss, J.O., Melkonian, M. and Chapman, D.J., editorial coordinator, McKhann, H.I., Jones and Bartlett Publishers, ISBN 0-86720-052-9 1990, S. 388-398). Besonders bevorzugt sind Mikroorganismen der Gattungen *Japonochytrium*, *Schizochytrium*, *Thraustochytrium*, *Althornia*, *Labyrinthuloides*, *Aplanochytrium* und *Ulkenia*. Ganz besonders bevorzugt sind hiervon *Schizochytrium* und *Ulkenia*. Insbesondere bevorzugt sind: *Japonochytrium* sp.

ATCC 28207, *Thraustochytrium aureum* (insbesondere ATCC 28211 bzw. ATCC 34304),
Thraustochytrium roseum ATCC 28210 *Thraustochytrium* sp. ATCC 20890, ATCC 20891,
 ATCC 20892 und ATCC 26185, *Schizochytrium aggregatum* ATCC 28209, *Schizochytrium*
 sp. ATCC 20888 und ATCC 20889, *Schizochytrium* SR21, sowie *Ulkenia* spec. SAM 2179
 5 und SAM 2180.

Für das erfindungsgemäße Verfahren geeignete Mikroorganismen sind sowohl Wildtyp
 Formen als auch Mutanten und daraus abgeleitete Stämme sowie rekombinante Stämme der
 entsprechenden Organismen. In besonderem Maße umfasst die vorliegende Erfindung
 Mutanten oder rekombinante Stämme zur Produktionssteigerung von PUFA.

Die Mikroorganismen im Sinne der vorliegenden Erfindung werden durch Animpfen eines
 flüssigen oder eines festen Mediums mit einer Vorkultur dieser Organismen kultiviert.

Für Mikroorganismen der Ordnung *Thraustochytriales* geeignete Kulturtechniken sind dem
 Fachmann gut bekannt. Typischerweise, aber nicht ausschließlich, wird die Kultur mittels
 wässriger Fermentation in einem entsprechenden Behältnis durchgeführt. Beispiele für
 15 typische Behältnisse für eine derartige Fermentation umfassen Schüttelkolben oder
 Bioreaktoren, wie beispielsweise STRs (stirred tank reactors) oder Blasensäulen. Die Kultur
 wird typischerweise bei Temperaturen zwischen 10°C und 40°C durchgeführt,
 bevorzugterweise zwischen 20°C und 35 °C, besonders bevorzugt zwischen 25°C und 30°C,
 ganz besonders bevorzugt zwischen 27°C und 29°C und insbesondere bei 28 ± 0,5°C.

20 In einer bevorzugten Ausführungsform der vorliegenden Erfindung entspricht der
 Calciumcarbonatgehalt des pH-stabilisierten Mediums einem Wert im Bereich von 3g/L bis
 15g/L, bevorzugt von 4g/L bis 12g/L und besonders bevorzugt von 5g/L bis 10g/L. Ganz
 besonders bevorzugt ist ein Calciumcarbonatgehalt von 7,5 ± 0,5g/L.

Das pH-Wert stabilisierte Medium umfasst ferner bevorzugterweise eine oder mehrere
 25 Kohlenstoffquellen, sowie eine oder mehrere Stickstoffquellen. Dem Fachmann sind für die
 Kultivierung von Mikroorganismen der Ordnung *Thraustochytriales* als Kohlenstoff- und
 Stickstoffquellen verwendbare Substanzen gut bekannt.

Verwendbare Kohlenstoffquellen sind beispielsweise Kohlenhydrate wie Glukose, Fruktose
 Xylose, Saccharose, Maltose, lösliche Stärke, Fucose, Glucosamin, Dextran, Glutaminsäure,
 30 Melasse, Glyzerin oder Mannitol oder auch Fette und Öle oder pflanzliche Hydrolysate.

Einsetzbare natürliche Stickstoffquellen sind beispielsweise Pepton, Hefeextrakt, Malzextrakt, Fleischextrakt, Casamino-säuren, Maisquellwasser oder Sojabohnen, einsetzbare organische Stickstoffquellen sind beispielsweise Glutamat und Harnstoff, aber auch anorganische Stickstoffquellen wie zum Beispiel Ammoniumacetat, Ammoniumhydrogencarbonat, Ammoniumsulfat oder Ammoniumnitrat können als Stickstoffquelle verwendet werden.

Das pH-Wert stabilisierte Medium kann neben Calciumcarbonat alle weiteren dem Fachmann für die Kultivierung von Mikroorganismen der Ordnung *Thraustochytriales* förderlichen Bestandteile enthalten, insbesondere anorganische Salze von beispielsweise Ca, Mg, Na, K, Fe, Ni, Co, Cu, Mn, Mo oder Zn. Beispielfhaft seien Phosphate wie Kaliumdihydrogenphosphat oder Chloride wie Magnesiumchlorid, Sulfate, wie Ammoniumsulfat, Magnesiumsulfat, Eisensulfat oder Natriumsulfat genannt. Weitere verwendbare anorganische Salze sind beispielsweise Halogenide, wie Kaliumbromid oder Kaliumjodid und ebenso weitere Carbonate wie zum Beispiel Natriumhydrogencarbonat.

Ggf. kann das Medium zusätzliche Makro- oder Mikronährstoffe umfassen, wie Aminosäuren, Purine, Pyrimidine, Corn Steep Liquor (Maisquellwasser), Proteinhydrolysate, Vitamine (wasserlöslich und/oder wasserunlöslich) und andere dem Fachmann gut bekannte Medienbestandteile. Antischaummittel können zugegeben werden, falls notwendig. Das Medium kann komplexe Bestandteile enthalten oder chemisch definiert sein.

Die Menge der einzelnen Komponenten kann variieren, solange kein negativer Effekt auf das Wachstum oder die Produktivität der Mikroorganismen vorliegt. Der Fachmann kann die Zusammensetzung entsprechend den Bedürfnissen des Mikroorganismus im Einzelfall leicht ermitteln. Im Allgemeinen wird die Kohlenstoffquelle in einer Konzentration bis 300 g/l und die Stickstoffquelle in einer Konzentration von 1 bis 30 g/l zugegeben. Vorzugsweise wird der Stickstoffgehalt in Abhängigkeit vom Kohlenstoffgehalt des Mediums gestellt.

Ein besonders bevorzugtes pH-Wert stabilisiertes Medium umfasst Glukose, Hefeextrakt, Maisquellwasser (Corn Steep Liquor [CSL]), Magnesiumchlorid, Calciumcarbonat, Calciumchlorid, Natriumsulfat und Kaliumphosphat.

Der pH-Wert des Mediums wird vor Beginn der Fermentation auf einen Bereich von 3 bis 10, bevorzugt 4 bis 8, besonders bevorzugt 5 bis 7 und ganz besonders bevorzugt etwa 6 durch Zugabe einer entsprechenden Säure oder Lauge eingestellt.

+ 27.10.04

Anschließend wird das Medium sterilisiert. Techniken zur Sterilisation von Medien sind dem Fachmann gut bekannt, beispielhaft seien Autoklavieren und Sterilfiltration genannt.

Die Kultivierung kann in Batch-, Fed-Batch- oder in kontinuierlicher Weise erfolgen, wie es dem Fachmann allgemein bekannt ist.

- 5 Eine Batch- oder Fed-Batch-Kultivierung erfolgt üblicherweise über 1 bis 12 Tage, bevorzugt 2-10 Tage, besonders bevorzugt für 3-9 Tage.

Die Medienbestandteile können dem Medium einzeln oder vermischt zugegeben werden, auch eine vorgefertigte Mischung ist denkbar. Die Bestandteile, insbesondere die Kohlenstoff- und Stickstoffquelle(n) oder bestimmte Mediumszusätze können vor oder während der Kultivierung zugegeben werden. Die Zugabe kann einmal oder mehrmals wiederholt oder auch kontinuierlich erfolgen.

Die produzierten PUFA liegen im Allgemeinen in Form von Neutralfetten zum Beispiel als Triacylglyceride oder polare Lipide wie zum Beispiel Phosphatidylcholin, Phosphatidylethanolamin oder Phosphatidylinositol vor.

- 15 Für die Zwecke der vorliegenden Erfindung werden unter den Begriffen PUFA, n3-Fettsäure oder n3-Wirkstoffe alle möglichen Formen verstanden, in denen die entsprechenden Fettsäuren vorliegen können, d. h. sowohl als freie Fettsäuren, Ester, Triglyceride, Phospholipide oder andere Derivate. All diese Substanzen werden im Folgenden zusammengefasst und die Begriffe werden synonym verwendet. Im weiteren können die PUFAs durch chemische oder biokatalytische Umesterung beispielsweise mit Hilfe geeigneter Enzyme (Lipasen) umgesetzt und angereichert werden, vor oder nach der Isolierung aus der Kultur.

- Die Isolierung von PUFAs aus den fermentierten Mikroorganismen bzw. dem Medium und die Analyse des Fettsäurespektrums erfolgt nach für den Fachmann bekannten und üblichen
25 Verfahren (Wanasundara, U.N., Wanasundara, J., Shahidi, F., Omega-3 fatty acid concentrates: a review of production technologies, Seafoods – Quality, Technology and Nutraceutical Applications, 2002, S. 157-174).

Nachfolgend wird das dem erfindungsgemäßen Verfahren zugrunde liegende pH-stabilisierte Fermentationsmedium anhand einiger Beispiele beschrieben. Das Fermentationsmedium sowie die Erfindung sind jedoch nicht auf diese Beispiele beschränkt.

- 5 **Beispiel 1:** Fermentation von *Ulkenia* spec. Stamm SAM 2179 zur Produktion von PUFA in verschiedenen, ausschließlich durch unterschiedliche Mengen von CaCO_3 pH-Wert stabilisierten Kulturmedien.

Ulkenia spec. Stamm SAM 2179 wurde in 300ml Erlenmeyerkolben mit einer Schikane in 50mL Medium kultiviert.

Medienzusammensetzung:

Fermentationsmedium:

Glucose	150g/L
Maisquellwasser	3,75g/L
15 KH_2PO_4	3g/L
Na_2SO_4	1g/L
$\text{MgCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$	1g/L
$\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$	0,3g/L
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	5g/L

20 Zusatz CaCO_3 je 50mL Kolben:	Medium 1.1	0g/L
	Medium 1.2	1g/L
	Medium 1.3	2g/L
	Medium 1.4	5g/L
	Medium 1.5	10g/L

- 25 pH-Wert mit NaOH auf 6,0 einstellen und autoklavieren

Kulturbedingungen:

Temperatur (°C):

28

Schüttelrate (rpm):

150

Zellernte erfolgte nach 96h Kultivierung durch Zentrifugation. Anschließend wurden die Zellen gefriergetrocknet und die Biotrockenmasse bestimmt. Aufschluß der Zellen und Bestimmung der Fettsäuren erfolgte durch Hitzebehandlung für 2 Stunden in 10%iger methanolischer Salzsäure bei 60°C (unter Rühren). Die Ester wurden dann im Gaschromatographen zur Bestimmung der Fettsäurezusammensetzung analysiert.

Tabelle1: Fermentationsparameter in Abhängigkeit von der Calciumcarbonatkonzentration

	CaCO ₃	Glukose- verbrauch	pH- Wert	BTM	DHA- Area	DHA/BTM	DHA	DHA-RZA
	(g/L)	(g/L)		(g/L)	(%)	(%)	(g/L)	(g/Lxd)
Medium 1.1	0	43,0	1,85	22,72	48,3	3,35	0,76	0,19
Medium 1.2	1	59,0	2,31	30,32	44,0	4,91	1,49	0,37
Medium 1.3	2	81,7	2,84	38,58	43,9	9,90	3,82	0,96
Medium 1.4	5	108,4	5,02	52,99	44,8	15,72	8,33	2,08
Medium 1.5	10	111,9	4,78	52,32	45,5	13,23	6,92	1,73

BTM: Biotrockenmasse; DHA/BTM: Gew.-% DHA (Docosahexaensäure) pro Gewichtseinheit BTM; g/lxd Raum-Zeit-Ausbeute in Gramm pro Liter pro Tag; RZA: Raum-Zeit-Ausbeute; DHA-Area (%) Anteil DHA im Fettsäurespektrum

Die Fermentation von *Ulkenia spec. SAM 2179* in Fermentationsmedium ohne ausreichende pH-Stabilisierung führt im Verlauf der Fermentation zu einer Verlangsamung des Glukoseverbrauchs und zur Einstellung des Wachstums, infolge eines starken Absinkens des pH-Wertes (siehe Medium 1.1. – 1.3.). Erst größere Mengen von CaCO₃-Puffer führen zu einer Stabilisierung des pH-Wertes während der Kultur (Medium 1.4 und 1.5). Dabei kommt es mit zunehmender CaCO₃-Konzentration auch zu einem erhöhten Glukoseverbrauch während der Kultur. Infolge der pH-Wert Stabilisierung und dem damit zusammenhängenden erhöhten Glukoseverbrauch werden höhere Biomassewerte und daraus resultierend auch

12.07.10.04

höhere DHA-Raum-Zeit-Ausbeuten, die unter den oben angegebenen Experimentalbedingungen bei etwa 2g/Lxd liegen, erzielt.

- 5 **Beispiel 2:** Fermentation von *Ulkenia spec.* Stamm SAM 2179 zur Produktion von PUFA in verschiedenen, ausschließlich durch unterschiedliche Mengen von CaCO_3 pH-Wert stabilisierten, Kulturmedien bis zur Glukoselimitierung.

Ulkenia spec. Stamm SAM 2179 wurde in 300ml Erlenmeyerkolben mit einer Schikane in 50mL Medium bis zum vollständigen Glukoseverbrauch kultiviert.

Medienzusammensetzung:

Fermentationsmedium:

Glucose	150g/L
Maisquell -wasser	3,75g/L
KH_2PO_4	3g/L
Na_2SO_4	1g/L
$\text{MgCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$	1g/L
$\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$	0,3g/L
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	5g/L

Zusatz CaCO_3 je 50mL Kolben: Medium 1.4 5g/L

Medium 1.5 10g/L

pH-Wert mit NaOH auf 6,0 einstellen und autoklavieren

Kulturbedingungen:

25 Temperatur (°C): 28

Schüttelrate (rpm): 150

Die Zellernte erfolgte nach 144,5h Kultivierung durch Zentrifugation. Anschließend wurden die Zellen gefriergetrocknet und die Biotrockenmasse bestimmt. Aufschluß der Zellen und Bestimmung der Fettsäuren erfolgte durch Hitzebehandlung für 2 Stunden in 10%iger methanolischer Salzsäure bei 60°C (unter Rühren). Die Ester wurden dann im Gaschromatographen zur Bestimmung der Fettsäurezusammensetzung analysiert.

Tabelle 2: Fermentationsparameter nach Glukoselimitierung

	CaCO ₃	Glukose- verbrauch	pH- Wert	BTM	DHA- Area	DHA/BTM	DHA	DHA-RZA
	(g/L)	(g/L)		(g/L)	(%)	(%)	(g/L)	(g/Lxd)
Medium 1.4	5	150,0	6,49	58,52	47,7	22,20	12,99	2,14
Medium 1.5	10	150,0	6,58	64,65	46,7	20,54	13,28	2,19

Die Fermentation von *Ulkenia* spec SAM 2179 in mit 5g/L bzw. 10g/L CaCO₃ gepufferten Medium ermöglicht eine Kultivierung bis zur Glukoselimitierung, ohne starkes Absinken des pH-Wertes. Die dabei erreichbare Biomasse und der Anteil von DHA pro Biomasse sind, mit etwa 58-64g/L Biomasse und 20-22% DHA/BTM, entsprechend dem vollständigen Glukoseverbrauch sehr hoch. Hierbei zeigt sich, dass die höhere CaCO₃-Konzentration (10g/L) zu einer größeren Biomasse führt, der Anteil der essentiellen PUFA DHA pro Biomasse gegenüber der niedrigeren Konzentration CaCO₃ (5g/L) jedoch etwas abnimmt. Die dabei erzielte Raum-Zeit-Ausbeute an DHA bleibt allerdings bei beiden Konzentrationen etwa gleich.

Beispiel 3: Kultivierung von *Ulkenia* spec. Stamm SAM 2179, zur Produktion von PUFA, unter optimierten Fermentationsbedingungen.

Ulkenia spec Stamm SAM 2179 wurde in 300ml Erlenmeyerkolben mit einer Schikane in 50mL Medium bis zum vollständigen Glukoseverbrauch kultiviert. Die Optimierung der Fermentation resultierte aus einer CaCO₃-Konzentration von 7,5g/L und einer veränderten

27.10.04

Vorkultur. Für die Vorkultur wurde anstelle einer Standkultur in DH1-Medium eine Schüttelkultur mit gleichem Medium verwendet (48h, 150rpm und 28°C).

Medienzusammensetzung:

Vorkulturmedium: DH1-Medium

- 5 Glukose-Monohydrat (g/l): 56,25
Hefeextrakt (g/l): 12,5 [Difco]
Tropic Marin (g/l): 16,65 [Dr. Biener GmbH, Wartenberg, Germany]

pH-Wert mit HCl auf 6,0 eingestellt

Fermentationsmedium:

- 10 Glucose 150g/L
Maisquell
-wasser 3,75g/L
KH₂PO₄ 3g/L
Na₂SO₄ 1g/L
15 MgCl₂·6H₂O 1g/L
CaCl₂·2H₂O 0,3g/L
(NH₄)₂SO₄ 5g/L

Zusatz CaCO₃ je 50mL Kolben: Medium 1.6 7,5g/L

pH-Wert mit NaOH auf 6,0 einstellen und autoklavieren

20 Kulturbedingungen:

Temperatur (°C): 28

Schüttelrate (rpm): 150

Die Zellernte erfolgte nach 99,75h Kultivierung durch Zentrifugation. Anschließend wurden die Zellen gefriergetrocknet und die Biotrockenmasse bestimmt. Aufschluß der Zellen und
25 Bestimmung der Fettsäuren erfolgte durch Hitzebehandlung für 2 Stunden in 10%iger

methanolischer Salzsäure bei 60°C (unter Rühren). Die Ester wurden dann im Gaschromatographen zur Bestimmung der Fettsäurezusammensetzung analysiert.

Tabelle 3: Fermentationsparameter unter optimierten Pufferbedingungen

	CaCO ₃	Glukose- verbrauch	pH- Wert	BTM	DHA- Area	DHA/BTM	DHA	DHA-RZA
	(g/L)	(g/L)		(g/L)	(%)	(%)	(g/L)	(g/Lxd)
Medium 1.6	7,5	150,0	6,76	63,84	44,1	23,06	14,72	3,54

Durch den Einsatz optimierter Fermentationsbedingungen, bei denen *Ulkenia spec.* SAM 2179 zunächst 48h bei 28°C und 150rpm in DH1-Medium kultiviert wurde, konnte die DHA-Raum-Zeit-Ausbeute auf mehr als 3,5g/Lxd erheblich verbessert werden. Dies resultiert in erster Linie aus einem schnelleren Wachstum, wobei die Glukoselimitierung in weniger als 100h erreicht wurde. Der Einsatz von 7,5g/L CaCO₃ im Fermentationsmedium ermöglicht eine für die optimierte Kultivierung notwendige pH-Stabilisierung. Der Einsatz von 7,5g/L CaCO₃ ergab sich aus den Ergebnissen von Beispiel 2, bei denen 10g/L CaCO₃ höhere Biomassewerte ergaben, 5g/L CaCO₃ hingegen zu besseren DHA-Werten führten. Somit wurde eine für die Produktion von DHA optimale CaCO₃-Konzentration (d.h. möglichst hohe Biomasse bei möglichst hohem DHA-Gehalt) zwischen 5 und 10g/L CaCO₃ vermutet. Neben der Stabilisierung des pH-Wertes führt der Einsatz des erfindungsgemäßen Fermentationsmediums zu einer überraschend hohen DHA Raum-Zeit-Ausbeute von über 3g/Lxd zum Zeitpunkt der Glukoselimitierung. Hierbei wurden ähnliche Biomassewerte wie in Beispiel 2 erreicht, darüber hinaus waren aber der Anteil an DHA pro Biotrockenmasse und die erzielten DHA-Mengen (mehr als 10%) größer.

Beispiel 4: Fermentation von *Ulkenia spec.* Stamm SAM 2179 zur Produktion von PUFA in Kulturmedium mit und ohne pH-Stabilisierung durch CaCO₃.

Ulkenia spec. Stamm SAM 2179 wurde jeweils in einem 5L-Fermenter bis zum vollständigen Glukoseverbrauch kultiviert.

16. 27.10.04

Medienzusammensetzung:

Fermentationsmedium:

	Glucose	150g/L
5	Maisquell -wasser	3,75g/L
	KH ₂ PO ₄	3g/L
	Na ₂ SO ₄	1g/L
	MgCl ₂ ·6H ₂ O	1g/L
	CaCl ₂ ·2H ₂ O	0,3g/L
	(NH ₄) ₂ SO ₄	5g/L

Für die Fermentation mit pH Steuerung: pH-Wert mit H₃PO₄ auf 4,0 einstellen und autoklavieren

15 Für die Fermentation ohne pH-Steuerung: pH-Wert mit NaOH auf 6,0 einstellen und autoklavieren sowie Zusatz von 7,5g/L CaCO₃

Kulturbedingungen:

Temperatur (°C): 28

Belüftung: 0,8vvm

Fermentation mit und ohne pH-Steuerung

20 **Tabelle 4:** Fermentationsparameter mit und ohne pH-Steuerung

pH- Steuerung	CaCO ₃ (g/L)	Glukose- verbrauch (g/L)	Zeitpunkt Glukose- verbrauch (h)	BTM (g/L)	DHA- Area (%)	DHA/BTM (%)	DHA (g/L)	DHA-RZA (g/L x d)
+	0	150,0	162	66,9	47,2	25,9	17,35	2,5
-	7,5	150,0	150	67,8	46,7	26,9	18,30	2,9

+ 27.10.04

Der Einsatz des erfindungsgemäßen, durch CaCO_3 -stabilisierten, Fermentationsmediums ermöglicht auch im 5L-Fermentationsmaßstab eine Kultivierung von *Ulkenia spec* SAM 2179 bis zur Glukoselimitierung, ohne pH-Steuerung. Der Einsatz von CaCO_3 in ausreichender Menge führt zu einem schnelleren Wachstum als Folge eines beschleunigten Glukoseverbrauchs. Darüber hinaus werden höhere Biomassen erzielt. Weiterhin werden in diesem Zusammenhang während der Fermentation ein erhöhter DHA-Anteil pro Biomasse und größere Mengen DHA erzielt. Dies führt zu einer nicht unerheblichen Steigerung der DHA-Raum-Zeit-Ausbeute bei CaCO_3 -gepufferter gegenüber pH-gesteuerter Fermentation von mehr als 15%.

10

Beispiel 5: Fermentation von *Schizochytrium spec.* SR21 zur Produktion von PUFA in Fermentationsmedium 1.6 stabilisiert durch 7,5g/L CaCO_3

15 *Schizochytrium spec.* Stamm SR21 wurde in 300ml Erlenmeyerkolben mit einer Schikane in 50mL Medium bis zum vollständigen Glukoseverbrauch kultiviert.

Medienzusammensetzung:

Vorkulturmedium: GY-Medium

Glukose (g/l):	30,0
20 Hefeextrakt (g/l):	10,0 [Difco]
Tropic Marin (g/l):	16,65 [Dr.Biener GmbH, Wartenberg, Germany]

pH-Wert mit HCl auf 6,0 eingestellt

Fermentationsmedium:

Glucose	150g/L
25 Maisquell -wasser	3,75g/L
KH_2PO_4	3g/L

18
27.10.04

Na₂SO₄ 1g/L

MgCl₂·6H₂O 1g/L

CaCl₂·2H₂O 0,3g/L

(NH₄)₂SO₄ 5g/L

5 Zusatz CaCO₃ je 50mL Kolben: Medium 1.6 7,5g/L

pH-Wert mit NaOH auf 6,0 einstellen und autoklavieren

Kulturbedingungen:

Temperatur (°C): 28

Schüttelrate (rpm): 150

10 Die Zellernte erfolgte nach 96h Kultivierung durch Zentrifugation. Anschließend wurden die Zellen gefriergetrocknet und die Biotrockenmasse bestimmt. Aufschluß der Zellen und Bestimmung der Fettsäuren erfolgte durch Hitzebehandlung für 2 Stunden in 10%iger methanolischer Salzsäure bei 60°C (unter Rühren). Die Ester wurden dann im Gaschromatographen zur Bestimmung der Fettsäurezusammensetzung analysiert.

15

Tabelle 5: Fermentationsparameter unter optimierten Pufferbedingungen

	CaCO ₃	Glukose- verbrauch	pH- Wert	BTM	DHA- Area	DHA/BTM	DHA	DHA-RZA
	(g/L)	(g/L)		(g/L)	(%)	(%)	(g/L)	(g/L x d)
SR 21	7,5	150,0	7,35	66,12	34,4	15,28	10,10	2,52

Das in der Erfindung beschriebene durch CaCO₃ pH-stabilisierte Medium führt auch bei anderen Organismen der *Labyrinthulomycota* zu einer Optimierung der Produktion von PUFA. So kann beispielsweise der Mikroorganismus *Schizochytrium* spec. Stamm SR21 in dem der Erfindung zugrunde liegenden Medium fermentiert werden. Die Raum-Zeit-Ausbeute der essentiellen PUFA, DHA in SR 21 ist etwas niedriger als in *Ulkenia* sp. SAM 2179 (siehe Beispiel 3), liegt aber bezogen auf die essentielle n-3 PUFA DHA über 15% (w/w) der gesamten Biotrockenmasse. Dieses Beispiel zeigt, dass das der Erfindung zugrunde

19
27.10.04

liegende optimierte pH-stabilisierte Medium eine Fermentation ohne pH-Steuerung zur Produktion von PUFAs auch in weiteren Mitgliedern der *Labyrinthulomycota* ermöglicht.

Patentansprüche:

1. Verfahren zur Kultivierung von Mikroorganismen der Gattung *Thraustochytriales*, dadurch gekennzeichnet, dass die Mikroorganismen in einem Fermentationsmedium ohne Zusatz pH-Wert stabilisierender Mittel außer CaCO_3 kultiviert werden.
2. Verfahren nach Anspruch 1, wobei die Mikroorganismen eine Produktion von mehr als 25, bevorzugt von mehr als 35 und ganz besonders bevorzugt von mehr als 45 Gew.-% Öl pro Gewichtseinheit Biotrockenmasse hervorbringen.
3. Verfahren nach Anspruch 1, wobei die Mikroorganismen eine Produktion von mehr als 10, bevorzugt von mehr als 14, besonders bevorzugt von mehr als 18, und ganz besonders bevorzugt von mehr als 22 Gew.-% DHA pro Gewichtseinheit Biotrockenmasse hervorbringen.
4. Verfahren nach einem der vorstehenden Ansprüche, wobei die Mikroorganismen eine Produktion von mehr als 1%, bevorzugt mehr als 2%, besonders bevorzugt mehr als 3% und ganz besonders bevorzugt von mehr als 4% DPA pro Biotrockenmasse hervorbringen.
5. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, wobei dem Medium 3g/L bis 15g/L, bevorzugt 4g/L bis 12 g/L, besonders bevorzugt 5g/L bis 10g/L und ganz besonders bevorzugt $7,5 \pm 0,5$ g/L CaCO_3 zugesetzt werden.
6. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 5 dadurch gekennzeichnet, dass das Medium Glukose, Maisquellwasser, Magnesiumchlorid, Calciumchlorid, Calciumcarbonat, Natriumsulfat, Ammoniumsulfat und Kaliumhydrogenphosphat umfasst.
7. Verfahren nach einem der vorstehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass das Medium einen pH-Wert zwischen 3 und 10, bevorzugt zwischen 5 und 7 aufweist.

8. Verfahren nach einem der vorstehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass die Kultivierung zwischen 10°C und 40°C erfolgt, bevorzugt zwischen 25°C und 35°C.
9. Verfahren nach einem der vorstehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass die Kultivierung für 1 bis 10 Tage erfolgt, bevorzugt für 3 bis 9 Tage.
10. Verfahren nach einem der vorstehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass der Mikroorganismus zur Gattung *Schizochytrium*, *Thraustochytrium* oder *Ulkenia* gehört.
11. Verfahren nach einem der vorstehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass der Mikroorganismus *Ulkenia* spec. SAM 2179 ist.
12. Verfahren nach einem der vorstehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass der Mikroorganismus *Schizochytrium* spec. SR 21 ist.
13. Verwendung eines Kulturmediums umfassend ausschließlich CaCO₃ als pH-Stabilisierungsmittel zur Kultivierung von Mikroorganismen der Ordnung *Thraustochytriales*.
14. Öl mit einem Gehalt von mindestens 20 Area(%) DHA, bevorzugt mindestens 30 Area(%) DHA und besonders bevorzugt mindestens 40 Area(%) DHA, hergestellt unter Anwendung eines Verfahrens nach einem der Ansprüche 1 bis 12 und nachfolgender Isolierung des Öls aus der Kulturbrühe und/oder der darin befindlichen Biomasse.
15. Öl mit einem Gehalt von mindestens 3% Area(%) DPA, bevorzugt mindestens 6 Area(%) DPA und besonders bevorzugt 9 Area(%) DPA, hergestellt unter Anwendung eines Verfahrens nach einem der Ansprüche 1 bis 12 und nachfolgender Isolierung des Öls aus der Kulturbrühe und/oder der darin befindlichen Biomasse.

+ 27.10.04

16. DHA mit mindestens 90%iger Reinheit, hergestellt unter Anwendung eines Verfahrens nach einem der Ansprüche 1 bis 12 und nachfolgender Isolierung der DHA aus der Kulturbrühe und/oder der darin befindlichen Biomasse.
17. DPA mit mindestens 90%iger Reinheit, hergestellt unter Anwendung eines Verfahrens nach einem der Ansprüche 1 bis 12 und nachfolgender Isolierung der DPA aus der Kulturbrühe und/oder der darin befindlichen Biomasse.
18. Biomasse erhältlich durch ein Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 12 und nachfolgender Trennung der Biomasse aus der Kulturbrühe.
19. Futtermittel umfassend Biomasse nach Anspruch 18.
20. Nahrungsmittel für die menschliche Ernährung umfassend Biomasse nach Anspruch 18.

21. Zusammenfassung

Die Erfindung beschreibt ein optimiertes Verfahren zur Herstellung von PUFAs, durch Kultivierung von Mikroorganismen aus der Gruppe der Stramenopiles in einem durch Calciumcarbonat pH-stabilisierten Fermentationsmedium, umfassend 3-15 g/L CaCO_3 und anschließende Isolation der PUFAs aus den Mikroorganismen und/oder dem Medium. Insbesondere werden neue optimierte Medien mit unterschiedlichem CaCO_3 -Gehalt beschrieben. Die Verwendung entsprechender Mengen CaCO_3 erlaubt eine erhebliche Vereinfachung der Prozeßführung während der Fermentation. Darüber hinaus lassen sich erhöhte Mengen DHA bei erhöhtem Ölgehalt in der Biomasse erzielen. Sie ermöglichen eine Fermentation von Mikroorganismen der Stramenopiles ohne pH-Steuerung und erlauben somit die Produktion von PUFA maßgeblich zu verbessern und erheblich zu vereinfachen

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☐ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☐ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☒ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☒ **OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.